

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08033492 A**

(43) Date of publication of application: **06 . 02 . 96**

(51) Int. Cl

C12P 13/20

(21) Application number: **07121505**

(22) Date of filing: **19 . 05 . 95**

(30) Priority: **20 . 05 . 94 JP 06106928**

(71) Applicant: **NIPPON SHOKUBAI CO LTD**

(72) Inventor: **HAYASHI TAKAYA
MUKOYAMA MASA HARU
SAKANO KOICHI**

(54) PRODUCTION OF L-ASPARTIC ACID

(57) Abstract:

PURPOSE: To produce L-aspartic acid on an industrial scale in high yield at a low cost without discharging a waste liquid containing a large amount of ammonium salt by a process capable of continuing the reaction over a long period without cooling the reactor.

CONSTITUTION: This process for the production of L-aspartic acid comprises the production of L-aspartic

acid from fumaric acid and ammonia or ammonium fumarate and the collection of the produced L-aspartic acid. The fumaric acid concentration is maintained to $\leq 13\text{wt.}\%$ before reaction, the reaction product is incorporated with 0.85-1.2 times mol (based on the produced L-aspartic acid) of fumaric acid after the reaction to effect the crystallization of L-aspartic acid and the mother liquor is reused after recovering the L-aspartic acid.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-33492

(43)公開日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 13/20

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

2121-4B

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平7-121505

(22)出願日 平成7年(1995)5月19日

(31)優先権主張番号 特願平6-106928

(32)優先日 平6(1994)5月20日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(72)発明者 林 隆哉

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(72)発明者 向山 正治

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(72)発明者 阪野 公一

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54)【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

(57)【要約】

【目的】 工業的に有利なL-アスパラギン酸の製造方法の提供。

【構成】 フマル酸とアンモニア又はフマル酸アンモニウムからL-アスパラギン酸を生成せしめ、それを採取することによるL-アスパラギン酸の製造方法において、反応前のフマル酸濃度を13重量%以下とし、反応後に、生成したL-アスパラギン酸に対して0.85～1.2倍モルとなるようにフマル酸を添加することによりL-アスパラギン酸を結晶化して回収し、母液を再使用することを特徴とする方法。

【効果】 反応器を冷却することなく長時間反応を継続することができ、且つ多量のアンモニウム塩を含有する廃液を伴わずに高収率でL-アスパラギン酸が製造できる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フマル酸とアンモニア及び／またはフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりレーアスバラギン酸を生成せしめる反応をフマル酸濃度13重量%以下で行い、次に反応済み媒体中に存在するレーアスバラギン酸に対して0.85～1.2倍モルのフマル酸を該反応済み媒体に添加することによりレーアスバラギン酸を析出させ、析出したレーアスバラギン酸の結晶を濾過水洗することによってレーアスバラギン酸を採取し、次いで母液と洗液にアンモニアを添加して基質媒体として再使用することの特徴とするレーアスバラギン酸の製造方法。

【請求項2】 フマル酸及び／またはその塩を0.1～3重量%随伴しており、かつ結晶の平均サイズが50～500 μ mであるレーアスバラギン酸を最終製品として採取する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 フマル酸及び／またはその塩を0.1～3重量%随伴しており、かつ結晶の平均サイズが50～500 μ mであるレーアスバラギン酸製品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、フマル酸とアンモニア又はフマル酸アンモニウムからレーアスバラギン酸を生産する際に、反応済媒体からの母液をリサイクル使用することによって、大量の硫酸アンモニウム塩など鉍酸のアンモニウム塩を含んだ廃水が排出されないように改良された方法及びフマル酸及び／またはその塩を随伴している結晶レーアスバラギン酸製品に関するものである。

【0002】

【従来の技術】レーアスバラギン酸はフマル酸とアンモニア又はフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を接触させることによって生産されている。通常この反応の際の基質の濃度は17.4～20重量%で行われており、高濃度であるため生産性がよいとされている。しかしながら、フマル酸とアンモニアの反応は10Kcal/molの発熱を伴う反応であるため、高濃度で反応を行う場合にはアスパルターゼの失活を防ぐために冷却が必要となっている。

【0003】実際に工業的に用いられている例を文献からあげると、アスパルターゼを固定化して反応器に充填し、連続的にフマル酸アンモニウム溶液を流通させて、この反応を行っている例では、フマル酸濃度が高いために発熱が大きく、アスパルターゼの失活を防ぐために、熱交換器を装着したカラム型の反応器が用いられている

(Applied Biochemistry and Biotechnology vol13,231 (1986))。また菌体を限外濾過膜などを用いて反応器内に閉じ込めることによってアスパルターゼを固定化した例では、反応器は熱交換器を装備しても比較的簡易な構造であるが、菌体を分離するのに特殊な膜を必要とする

2

ことなど、工程上の問題点を有している。

【0004】また生成物であるレーアスバラギン酸の分離に関して、通常は、反応済み媒体からレーアスバラギン酸を回収するためには、硫酸などの鉍酸を用いて、反応済み媒体のpHをレーアスバラギン酸の等電点であるpH2.7程度に調節後、冷却することによってレーアスバラギン酸の結晶を析出させ、これを濾別する方法がとられている。

【0005】この方法は安価な鉍酸を用いること、生産物であるレーアスバラギン酸の結晶としての回収率が高いこと、得られるレーアスバラギン酸の純度が高いことから工業的に用いられている。しかしながら、原料としてのアンモニアのロスが大きく、さらに高濃度の硫酸アンモニウムなどの鉍酸のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されるという問題点を有している。水溶液中のアンモニウムイオンの除去は廃水処理の面でも非常に困難であり、湖沼や瀬戸内海などの内湾ではアンモニウムイオンを含む窒素濃度が上昇することによる水質汚染など問題が生じてきている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明では、前記のような複雑な反応器、特殊な膜を必要としない簡単な工程によって、且つ多量のアンモニウム塩を排出しない、レーアスバラギン酸の製造方法を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは反応に伴う発熱の問題、高濃度のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されない、簡易なレーアスバラギン酸の製造方法について鋭意検討を行った結果、基質であるフマル酸の濃度を13重量%以下に低くすること、得られたレーアスバラギン酸アンモニウム含有反応済み媒体中に、硫酸などの鉍酸のかわりにレーアスバラギン酸の原料であるフマル酸を添加すると、レーアスバラギン酸アンモニウム塩とフマル酸との間で塩の交換が起こり、レーアスバラギン酸とフマル酸モノアンモニウム塩となり、溶解度の低いレーアスバラギン酸が結晶として分離できること、また添加するフマル酸量はレーアスバラギン酸と大体当量用いるとレーアスバラギン酸の結晶としての回収率が高くなることの発見し、本発明を完成させるに至った。

【0008】基質であるフマル酸の濃度を低くすると、発熱を少なくすることができるため、アスパルターゼの反応熱による失活を防ぐことができる。また、鉍酸のかわりにフマル酸を用いて生成物であるレーアスバラギン酸の晶析を行う場合も、13重量%以下の低濃度の場合には単に生成したレーアスバラギン酸とほぼ当量のフマル酸を添加して攪拌し、濾過、水洗浄するだけで、特に加熱、冷却の操作を要せずにレーアスバラギン酸を晶析分離することができる。

【0009】固定化酵素触媒を用いる反応では、高濃度のフマル酸を基質として反応を行うと反応熱が大きく、温度上昇も大きいので、固定化酵素の活性が高ければ高いほど、酵素の熱失活を防ぐための冷却が必要になり、反応器の構造が複雑になったり、反応率の管理が複雑になったりする。

【0010】しかし、基質であるフマル酸濃度13重量%以下、特に1モル/リ以下の濃度での反応では、例えば25℃程度のフマル酸溶液を固定化酵素を充填した反応器に導入した場合、全く冷却を行わなくても反応器中で完全に平衡まで反応が進行したとしても、温度上昇は10℃程度にすぎず、最高温度は35℃程度である。このような温度範囲では酵素の熱失活の問題がないので、固定化酵素の活性を最大限利用できるようになり、高流速、高転換率での反応を長期間、安定に行うことができるようになる。

【0011】また、このような濃度範囲では、生成したL-アスパラギン酸を晶析させるのに、生成したL-アスパラギン酸に対して、だいたい当量のフマル酸を添加して攪拌、濾過するだけで、何等加熱、冷却などの操作を要せずにL-アスパラギン酸を高回収率で分離することができる。

【0012】従って本発明はフマル酸とアンモニア及び/またはフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめる反応をフマル酸濃度13重量%以下で行い、次に反応済み媒体中に存在するL-アスパラギン酸に対して0.85~1.2倍モルのフマル酸を添加することによりL-アスパラギン酸を析出せしめ、析出したアスパラギン酸の結晶を濾過水洗浄することによってL-アスパラギン酸を採取し、次いで母液と洗液にアンモニアを添加して基質媒体として再使用することを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法を提供する。本発明はまた、上記の方法により製造された、フマル酸を含有する工業用結晶L-アスパラギン酸製品を提供する。

【0013】

【発明の効果】本発明によれば、L-アスパラギン酸を製造するに要する設備を簡易な構造にできるため、設備のコストを削減することができる。またL-アスパラギン酸の製造に際して、アンモニウム塩を含有する大量の廃水を排出しない。さらには反応済み媒体からの母液をリサイクルするため、結晶を分離した濾液中に溶解しているL-アスパラギン酸も次のサイクルで回収されるので、原料基質の有効利用が図られ、環境面でも経済面でも従来法より有利なL-アスパラギン酸の製造方法を提供することができる。

【0014】

【具体的な説明】以下本発明の方法について実施態様を説明するが、本発明はかかる実施態様のみに限定される

ものではない。本発明に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物は、例えば、高アスパルターゼ活性を有することが知られている大腸菌やBrevibacterium属の微生物などの菌体、あるいは超音波、摩擦、凍結融解、酵素処理、界面活性剤処理などを施して破砕した菌体破砕物、さらに硫酸アンモニウム塩析、アセトン沈澱等常法により得られる部分精製したもの、あるいはクロマトカラム等常法で得られる精製したものであり、そのいずれでも反応に使用できる。

【0015】これらのアスパルターゼ活性含有微生物菌体、あるいはその処理物または酵素を担体に固定化して用いることもできる。固定化の担体としては、セルロース、アルギン酸、カラギーナン、マンナンゲルなどの天然系高分子、あるいはイオン交換樹脂やポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドなどの適当な合成系高分子を常法により用いることができる。固定化することにより、アスパルターゼまたはアスパルターゼ含有物と生産物との分離が容易になり、反応済み媒体からの母液の循環使用の操作をより容易に行うことが可能である。

【0016】また、反応に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物中に含まれるフマラーゼ活性など該反応の妨げになりうるアスパルターゼ活性以外の酵素活性を予め失活させた後に反応に用いることも可能である。例えば、酵素含有物を、予め、L-アスパラギン酸およびアンモニウムイオン存在下、アルカリ域で40~60℃に加熱処理を行うことでフマラーゼ活性を予め失活させておくこともできる。

【0017】本発明に用いられる基質はフマル酸あるいはフマル酸塩から選ばれるものであって、これらの混合物でもよい。また本発明に用いられるアンモニアはガス状アンモニア、アンモニア水溶液等が使用可能であるが、取扱上アンモニア水溶液が有利である。アンモニア水の濃度としては特に限定されるものではないが、工業的には10~35重量%が利用するのに好ましい。

【0018】使用されるアンモニアの量は反応に供されるフマル酸に対して1.0倍モル以上3倍モル以下が好ましい。アンモニアの量が1倍モル未満ではL-アスパラギン酸の回収率が低下する結果を招いてしまい好ましくない。またアンモニア量が3倍モル以上では反応に関与する酵素又は酵素含有物の安定性が悪くなる可能性が高く好ましくない。また必要に応じて上記のアンモニア量の範囲で水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物を併用することもできる。なお、反応液のpHは5~10の範囲、好ましくは7.0~9.0の範囲、さらに好ましくはアスパルターゼの至適pHである8.0~9.0にするのが好ましい。

【0019】フマル酸とアンモニアを混合する場合、混合はどのように行ってもよいが、両者の全量を一度に混合するのではなく、一方の全量に対して他方を徐々に添加するのが好ましく、特にフマル酸の懸濁液に対してア

ンモニアまたはアンモニア水を徐々に添加するのが好ましい。本発明の方法において基質媒体の調製に用いる反応媒体は、水性のものであれば特に限定されず、最も典型的なものは水である。さらに緩衝液、例えばリン酸緩衝液等の常用の緩衝液を用いることもできる。反応の際のフマル酸濃度は通常5~13重量%が好ましいが、生産性を考慮すると特に10~13重量%の範囲の水溶液で反応させるのが効果的である。

【0020】また基質媒体にはさらに塩化マンガ、硫酸マンガなどのマンガ塩、または塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩、または亜鉛塩、カルシウム塩、ニッケル塩、コバルト塩、鉄塩などの2価金属塩を0.1~50mM、好ましくは1~10mMの濃度で添加することが望ましい。本発明における反応槽の態様は特に限定されないが、例えばバッチ型反応装置、カラム型反応装置など従来から知られている反応槽で反応を行うことができる。反応槽は1つであっても複数であっても差し支えない。反応の際の温度は低温では反応速度が低下するため通常20℃程度を下限とし、高温下ではアスパルターゼの失活を招くため50℃程度を上限とするのが好ましく、より好ましくは25~40℃の範囲で行うのがよい。

【0021】上記のような条件でフマル酸とアンモニアを反応させた後、得られた反応済み媒体中にフマル酸を添加することにより、L-アスパラギン酸を析出させる。また、母液の循環使用の妨げにならない範囲でフマル酸塩の添加も可能である。フマル酸塩としては、フマル酸アンモニウム、フマル酸ナトリウム、フマル酸カリウムなどが使用される。

【0022】前記したフマル酸などを用いてL-アスパラギン酸の析出を行うことにより母液の循環使用が可能になる。析出に鉍酸を用いると鉍酸のアンモニウム塩が蓄積し、母液を循環使用するためには脱塩工程が必要になり好ましくない。ここでL-アスパラギン酸の析出のために添加されるフマル酸は固体でもよく、またフマル酸を水に懸濁させたスラリーとして添加することも可能である。いずれにせよ無機塩が生成しないため晶析物や母液からの無機塩の除去操作を不要にすることが可能である。

【0023】L-アスパラギン酸の析出のために反応済み媒体に添加されるフマル酸の量は、生成したL-アスパラギン酸に対してほぼ当量用いればよく、好ましくは反応済み媒体中に生成しているL-アスパラギン酸に対して0.85~1.2倍モル、好ましくは0.85~1.1倍モル添加してL-アスパラギン酸を析出させることができる。

【0024】この範囲より少ないと結晶として分離できるL-アスパラギン酸の量が少なくなり、回収率が低くなり好ましくない。またこの範囲より多いとL-アスパラギン酸の結晶にフマル酸塩が大量に混入してくるため

好ましくない。L-アスパラギン酸を析出せしめる際には反応済み媒体にフマル酸を徐々に添加していくほうが好ましい。この方法であれば、析出したL-アスパラギン酸の結晶は大きく、遠心濾過などによる母液からの分離が容易になり、また結晶の取り扱いも容易になる。

【0025】フマル酸を添加した反応済み媒体は0~100℃で、10分間~4時間、好ましくは、20~80℃で30~120分間攪はんして塩の交換、晶析を完了させる。析出したL-アスパラギン酸の分離方法については、吸引濾過や遠心濾過など通常の方法で行うことができるが、含液率を低くすることができる遠心濾過などの方法がより好ましい。

【0026】分離されたL-アスパラギン酸の結晶は必要に応じて水を用いて洗浄される。洗浄を行うことにより、L-アスパラギン酸の結晶に少量混入してくるフマル酸塩の量を少なくすることができ、得られるL-アスパラギン酸の結晶の純度を高くすることができるので好ましいが、母液の再利用を考えた場合、あまり大量の水で洗浄することは好ましいことではない。使用する洗浄水の量は、L-アスパラギン酸結晶の量に対して5~500重量%、好ましくは10~200重量%の範囲で用いるのがよい。

【0027】このようにして極めて簡単な方法で少量の、例えば0.1~3重量%、好ましくは0.1~1重量%のフマル酸及び/またはフマル酸塩を含有するL-アスパラギン酸の結晶を得ることができる。こうして得られるL-アスパラギン酸の結晶のサイズは晶析の方法を変えることにより所望の平均サイズにすることができるが、特に取扱やすい結晶の平均サイズとして50~500μmの範囲の結晶を得ることも可能である。このL-アスパラギン酸は工業用アスパラギン酸として極めて有用である。また、このL-アスパラギン酸はさらに精製を繰り返すことによって、食品添加物、医薬品用などに用いることも可能である。

【0028】L-アスパラギン酸の結晶を分離した母液は、前記洗液と混合し、アンモニアを添加してL-アスパラギン酸の製造用の基質媒体として再使用する。必要に応じてフマル酸を添加したり、母液あるいは洗液を濃縮したりして適宜調整を行う。例えば、L-アスパラギン酸を析出させるために加えたフマル酸のモル数に対して、結晶として分離されたL-アスパラギン酸のモル数が多いと、その後のフマル酸とアンモニアの反応で得られるL-アスパラギン酸の量が少なくなっていくため、必要に応じてフマル酸を追加することによって、L-アスパラギン酸を析出せしめる前の反応済み媒体中に含まれていたL-アスパラギン酸に対して、それを析出せしめる際に添加したフマル酸と追加するフマル酸の合計の量が0.85倍モルから1.2倍モルになるように調整する。

【0029】また必要に応じて母液を濃縮することによ

って容量を初期基質媒体と同じ容積とするなど調整し、フマル酸に対するアンモニアの比が1~3倍モルになるように調節したのち、フマル酸とアンモニアのアスパルターゼ活性を有する酵素含有物による反応、フマル酸の添加によるL-アスパラギン酸の析出、L-アスパラギン酸の結晶の分離、母液の調整を繰り返すことにより、母液が基質媒体として循環使用される。本発明によれば、母液の循環は10回以上可能である。

【0030】母液へのアンモニアの添加は、例えば、次の点を考慮して行うのが、母液の循環使用を繰り返すために、また微生物菌体あるいはその破砕物のアスパルターゼ活性を長く保つためには好ましい。すなわち、循環使用される母液中に含まれるアンモニア量が該母液に含まれるフマル酸に対して1~3倍モル、好ましくは1.5~2.5倍モルになるように、アンモニアを添加する。

【0031】本発明では、フマル酸とアンモニアあるいはフマル酸アンモニウム塩を、フマル酸に対してアンモニアの量が1~3倍モルとなる量で用い、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物と20~50℃で反応させる。この反応によりL-アスパラギン酸アンモニウムが生成するが、得られた反応済み媒体に、フマル酸を添加してL-アスパラギン酸を析出させる。

【0032】析出したL-アスパラギン酸を母液から分離してL-アスパラギン酸が得られる。採取したL-アスパラギン酸はフマル酸及び/またはその塩を随伴しているが、水洗を行うことによりその量を減少させることができる。析出物を分離した母液はL-アスパラギン酸結晶を洗浄した液とともに、L-アスパラギン酸の製造用基質媒体として循環使用を繰り返すことができる。これにより、原料の効率的利用、及び、廃棄物の減少が図られる。

【0033】

【実施例】次に実施例をあげて説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

実施例1. 5Lジャーフェーマンターに1L当りフマル酸20g、リン酸1カリウム1g、硫酸マグネシウム7水塩0.5g、酵母エキス20g及びコーンステープリカー20gを水に溶解し、pHをアンモニアで6.8に調節した培地3Lを仕込み滅菌したのち、別に500ml振とうフラスコに同上の培地50mlを入れて培養しておいたエッシャーヒア・コリ(*Escherichia coli*) (ATCC 11303)を接種し、37℃で通気攪拌培養した。培地中のフマル酸が消失した時点で、菌体培養液に酢酸を加え、pHを約5にして45℃、1時間放置後、培養液を遠心分離にかけ、菌体を分離した。この菌体を、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0034】凍結菌体を融解させ50mMのリン酸緩衝液5Lに懸濁した中に、イオン交換樹脂デュオライトA-7 (米国ダイヤモンドシャムロックケミカル) 1.5L

を添加し、4℃で24時間、攪拌を行い、イオン交換樹脂に菌体中の酵素を吸着させた。イオン交換樹脂1Lあたり14.5gのアスパルターゼを含む酵素タンパクが吸着された。この酵素を吸着させたイオン交換樹脂1.5Lを全容2Lの円筒型カラムに充填し、カラム全体を発泡ポリスチレンの保温材で覆って保温した。

【0035】このカラムに、1L中にフマル酸116gと硫酸マグネシウム7水塩0.2gを含有するフマル酸アンモニウム水溶液(pH8.3)を基質媒体として1.5L/hrの速度で流通させた。反応温度はカラムの直前に30℃の恒温槽を設置して、カラムに流入する基質媒体の温度が30℃になるようにし、カラム自体は保温するだけにした。この条件で連続反応を行ったところ、30日以上、98モル%以上の転化率で安定に運転することができた。

【0036】比較例1. 1L中にフマル酸200gと硫酸マグネシウム0.2gを含有するフマル酸アンモニウム水溶液を基質媒体として用いた以外は実施例1と同様にして連続反応を行った。反応初期の転化率は99.2モル%であった。14日後、カラムから流出する反応済み媒体を分析したところ転化率85モル%であった。また30日目後の転化率は75モル%であり、高い転化率を維持することはできなかった。

【0037】実施例2. 5Lジャーフェーマンターに1L当りフマル酸20g、リン酸1カリウム1g、硫酸マグネシウム7水塩0.5g、酵母エキス20g及びコーンステープリカー20gを水に溶解し、pHをアンモニアで6.8に調節した培地3Lを仕込み滅菌したのち、別に500ml振とうフラスコに同上の培地50mlを入れて培養しておいたエッシャーヒア・コリ(*Escherichia coli*) (ATCC 11303)を接種し、37℃で通気攪拌培養した。培地中のフマル酸が消失した時点で、菌体培養液に酢酸を加え、pHを約5にして45℃、1時間放置後、培養液を遠心分離にかけ、菌体を分離した。この菌体を30等分し、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0038】フマル酸100g、硫酸マグネシウム7水塩0.25gを水約600mlに加えた後、25%アンモニア水で中和してpHを8.3に調節後、水を追加して1Lの基質媒体とした。この基質媒体に先に30等分した凍結菌体の一つをいれ、37℃で穏やかに振とうしながら5時間反応させた。反応済み媒体の分析の結果、初期仕込みフマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸アンモニウムが生成していた。

【0039】この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸100gを添加し、30分間攪拌してL-アスパラギン酸を晶析させた。晶析後、吸引濾過器で濾過して母液からL-アスパラギン酸の結晶を分離し、この結晶を水50mlで洗浄し、十分に水分をきった後、乾燥させた。得られたL-アスパラギン酸結晶は111.8g、純度96.5重量%(水分除く)(フマル

酸3.1重量%) (平均サイズ100 μ m)であった。

【0040】ついで、先の母液と洗液をあわせて、減圧下で濃縮した後、25%アンモニアを加えてpHを8.3に調節し、水を加えて1Lの基質媒体とした。この基質媒体に先と同様に凍結菌体の一つをいれ37℃で5時間反応させた。先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、反応済み媒体にフマル酸100gを添加して攪拌晶析を行った。析出したL-アスパラギン酸を吸引濾過して母液からL-アスパラギン酸の結晶を分離し、この結晶を約50mlの水で2回結晶を洗浄し、十分に水をきった後、乾燥した。得られた結晶の重量は114.2g、純度は99.0重量% (水分除く) (フマル酸0.70重量%) (結晶平均サイズ80 μ m)であった。

【0041】同様に母液と洗液をあわせて減圧濃縮した後、25%アンモニアでpHを8.3に調節し、水を加えて1Lの基質媒体とした。以下、2回目の操作を繰り返し、フマル酸とアンモニアの反応を合計10回行った (母液の循環使用回数は9回)。10回の操作により、得られたL-アスパラギン酸は、9回目の操作において晶析のために添加されたフマル酸に対して収率98.0モル%、純度99.0重量% (水分除く) (フマル酸0.61重量%) (結晶平均サイズ100 μ m)であった。

【0042】10回目の繰り返し操作により得られた結晶に水100mlを加えてよく混合した後、再度吸引濾過し、十分に水分をきり、乾燥する操作を繰り返し3回行ったところ、結晶の純度は99.6重量% (水分除く) (フマル酸0.13重量%) (結晶平均サイズ60 μ m)になった。

【0043】実施例3. 実施例2と同様にして1Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.2モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸90gを添加し30分間攪拌し、L-アスパラギン酸を晶析させた。晶析後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約900mlを得た。濾別したL-アスパラギン酸を水50mlで洗浄し、十分に水分をきって乾燥した。得られた結晶の純度を調べたところ、重量112.4g、純度99.4重量% (フマル酸0.5重量%)であった。

【0044】ついで、先の母液と母液をあわせて、減圧下で濃縮し、フマル酸10gと25%アンモニア水を加えてpHを8.3に調節し、水を加えて1Lの基質媒体とした。この基質媒体に先と同様に凍結菌体の一つをいれ、37℃で5時間反応させた。この反応済み媒体を先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸90gを添加して30分間攪拌して晶析を行った。析出したL-アスパラギン酸の結晶を吸引濾過し、水50mlで結晶を洗浄し、十分に水分をきったのち、乾燥した。得られた結晶の重量は113.3g、純度は99.2重量%

(フマル酸0.6重量%) (結晶平均サイズ100 μ m)であった。

【0045】比較例2. 実施例2と同様にして1Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ、37℃で穏やかに振とうしながら5時間反応させた。反応済み媒体の分析の結果、初期仕込フマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸70gを添加し、30分間攪拌してL-アスパラギン酸を晶析させた。晶析後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約920mlを得た。濾別したL-アスパラギン酸を水50mlで吸引しながら洗浄し、乾燥した。得られた結晶の純度を調べたところ、重量83.3g、純度99.3重量% (フマル酸0.45重量%)であった。

【0046】実施例4. 1L中にフマル酸116g、硫酸マグネシウム0.2gを含有するフマル酸アンモニウム水溶液 (pH8.3) を基質媒体として用いた以外は実施例2と同様にして、1Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.2モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸104.4gを添加し30分間攪拌し、L-アスパラギン酸を晶析させた。晶析後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約890mlを得た。濾別したL-アスパラギン酸を水50mlで吸引しながら洗浄し、乾燥した。得られた結晶の純度を調べたところ、重量126.4g、純度99.0重量% (フマル酸0.7重量%) (結晶平均サイズ150 μ m)であった。

【0047】ついで、先の母液と洗液をあわせて、減圧下で濃縮し、フマル酸11.6gと25%アンモニア水を加えてpHを8.3に調節し、水を加えて1Lの基質媒体とした。この反応済み媒体に先と同様に凍結菌体の一つをいれ、37℃で5時間反応させた。この反応済み媒体を先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸104.4gを添加して30分間攪拌して晶析を行った。析出したL-アスパラギン酸の結晶を吸引濾過し、水50mlで結晶を洗浄し、十分に水分をきったのち、乾燥した。得られた結晶の重量は132.8g、純度は99.1重量% (フマル酸0.7重量%) (結晶平均サイズ120 μ m)であった。

【0048】比較例3. 1L中にフマル酸150g及び硫酸マグネシウム0.2gを含有するフマル酸アンモニウム水溶液 (pH8.3) を基質媒体として用いた以外は実施例2と同様にして、1Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.1モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸135gを添加し、30分間攪拌してL-アスパラギン酸を晶析させた。晶析後、吸引濾過器で吸引濾過し、水50mlで洗浄して乾燥

した。得られた結晶の純度を調べたところ、重量25 *にまとめた。

0.1g、純度67.8重量%（フマル酸30.3重量 【0049】

%）であった。以上の実施例、比較例の結果を以下の表* 【表1】

	初期フマル酸 濃度	添加フマル酸 (モル比)	回収率 (%)	純 度 (%)
実施例2	10	1.00	95.0	96.5
実施例3	10	0.90	98.2	99.4
実施例4	11.6	0.90	94.8	99.0
比較例2	10	0.70	72.9	99.3
比較例3	15	0.90	99.5	67.8

表に示されるとおり、添加するフマル酸のモル比が小さいと、結晶として分離できるL-アスパラギン酸の回収率が低くなり、初期フマル酸濃度が高くなると得られる

L-アスパラギン酸結晶の純度が低くなることがわかる。

